基于 cpDNA 单倍型多态性的草果栽培地理起源证据

赵小丽 [1, 2]，杨耀文 [1]，李国栋 [1*]

（1. 云南中医药大学 云南省傣医药与彝医药重点实验室，昆明 650500；2.德宏州人民医院，云南 芒市 678400）

摘要 为了探索草果（*Amomum tsaoko*）的栽培地理起源，该研究检测了草果、拟草果（*A. paratsao-ko*）的 cpDNA 序列变化，获取单倍型多态性信息。结果表明：20 个草果居群 259 个植株、5 个拟草果居群 58 个植株共检测到 7 种单倍型；草果有 3 种单倍型（H1、H3、H6），拟草果有 6 种单倍型（H1、H2、H3、H4、H5、H7）。H1 和 H3 为共享单倍型，H6 为草果私有单倍型，H2、H4、H5、H7 为拟草果私有单倍型。H1 为普通单倍型，H2 为祖先单倍型。草果居群遗传多样性远小于拟草果居群，遗传变异主要来源于居群内，拟草果居群主要来源于居群间。麻栗坡铁厂（TC）、屏边玉屏（YP）居群的遗传多样性、单倍型多样性高于其他 18 个草果居群。进一步分析表明：包含屏边、马关、西畴、麻栗坡的云南东南部前端地域，和邻接的广西那坡可能共同构成草果栽培驯化起源中心，以麻栗坡为核心区域，向周边的西畴、马关、屏边、那坡扩张。建议对 TC、YP、那坡下华（XH）居群加以保护。上述结果为草果种质资源保护、利用提供了遗传学信息。

关键词：草果，拟草果，单倍型，栽培地理起源

中图分类号：Q941　　文献标识码：A

Evidence for geographical origin of domestication of *Amomum tsaoko* (Zingiberaceae) based on polymorphism of cpDNA

收稿日期：2020-09-28

基金项目：国家自然科学基金（81660631）；云南省应用基础研究—中医联合重点项目（2018FF001-010）；云南省应用基础研究－中医联合专项项目（2017FF116-004）；重大科技专项（2018ZF010-1）［Supported by the National Natural Science Foundation of China（81660631）, Key Fund for Traditional Chinese Medicine Cooperation of Application Fundamental Research in Yunnan Province（2018FF001-010），Special Fund for Traditional Chinese Medicine Cooperation of Application Fundamental Research in Yunnan Province（2017FF116 -004），Major science and technology projects（2018ZF010-1）］。

作者简介：赵小丽（1994-），硕士，中药士，主要从事药事管理、药事服务及临床药学研究（E-mail）2407560335@qq.com。

* 通讯作者简介 李国栋，博士，副教授，研究方向为中药资源保护与利用，（E-mail）gammar116@163.com。

ZHAO Xiao-Li[1, 2], YANG Yao-Wen[1]，LI Guo-Dong[1*]

(1. *Yunnan Key Laboratory of Dai and Yi Medicines*, *Yunnan University of Chinese Medicine*, Kunming 650500, China; 2. *The People's Hospital of Dehong Introduction*, Mangshi 678400, Yunnan, China)

Abstract In order to investigate the geographical origin of domestication of *Amomum tsaoko,* two hundreds and seventy-two individuals were sampled to represent 20 populations of *A. tsaoko*, and sixty-two individuals of 5 populations of *A. paratsao-ko* were sampled as a related species materials. For acquiring genetic diversity informations, the sequence variations of their cpDNA were carried out. The results showed that we detected 7 haplotypes by the combined sequences, i.e. 3 haplotypes (H1, H2 and H3) were found in *A. tsaoko* populations, and 6 haplotypes (H1, H2, H3, H4, H5 and H7) were found in *A. paratsao-ko* populations. 2 haplotypes (H1 and H3) were shared by the two species. H1 was common haplotype, H2 was ancestral haplotype and H6 was specific haplotype to *A. tsaoko*, while H2, H4, H5 and H7 were specific to *A. paratsao-ko*. The genetic diversity of *A. tsaoko* was lower than that of *A. paratsao-ko* and mainly existed within populations. The genetic diversity of *A. paratsao-ko* mainly existed among different populations. The genetic diversity and the haplotype diversity (H_d) of the two populations (TC and YP) were all higher than other 18 populations of *A. tsaoko*. Further analyses indicated that the domesticated region of *A. tsaoko* would include Maguan, Xichou and Malipo, where at the front area of southeast Yunnan, and the area near Napo, Guangxi. Malipo would be the core domestication of *A. tsaoko* in the region, then the related area would expand to Xichou, Maguan, Pingbian and Napo. TC, YP and XH populations were proposed to protect their genetic diversity. The results of the two species were expected to provide genetic information and theoretical reference for protection and utilization of the germplasm resources.

Key words: *Amomum tsaoko*, *A. paratsao-ko*, haplotype，geographical origin of domestication

草果（*Amomum tsaoko*）果实入药，味辛性温，有温中健胃、消食顺气、祛寒湿的功能（中国药典委员会，2020），也常作辛香料添加于食物中。草果主产于中国云南，在越南亦有分布（Wu & Raven，2000）。云南的栽培历史悠久，截至 2004 年，云南的种植面积和产量均占全国的 90%以上（明建鸿，2004）。草 果的栽培起源是一个迄今未解决的基础问题，

而产量和质量的提高又是目前云南草果产业发展亟待解决的核心问题。通过阐明草果的栽培起源，认识其栽培驯化后的遗传结果，有利于瞄准优良种质资源提高品质。

Xia（2004）研究表明豆蔻属（*Amomum*）是一个并系类群，属下的草果、拟草果（*A. paratsao-ko*）和姜味砂仁（*A. coriandriodrorum*）共同组成一个单系。拟草果是草果亲缘关系最近的同属野生植物，它们的果实光滑、唇瓣顶端全缘而薄。前期资源调查、样品采集中发现云南文山州、红河州等草果传统产区通常有野生拟草果植株伴生，果实偶有混入草果，是草果药材的混淆品。但由于它们种子挥发油成分不同，不能当作同一药材（徐国钧，1997）。广西那坡规六村（原属下华乡，后并入百省乡）邻近村 1968 年采收周围野生拟草果果实育苗种植，果实食用。海拔≥1 200 m，草果结果较多；海拔 900 m，草果开花多，结果极少或基本不结实，而拟草果大量结果。干旱、光照多或少，草果生长不好或死亡，而拟草果都生长很好。草果果实成熟后不脱落，拟草果果实较小，成熟后脱落而腐烂。姜味砂仁因根茎、叶、果实有芫荽的味道（Wu & Raven，2000）而易于识别，前期研究未发现在草果居群周围有分布。因此，研究中将拟草果作为外类群。

居群分化过程是一个遗传地、系统发生的过程。一个物种现有的居群结构不仅能反映目前基因交流的模式，也能反映谱系分隔的历史，而阐明居群分化过程是研究进化多样性的基础（Kenneth & Barbara，1999）。植物 cpDNA 具有分子量小、结构简单且多拷贝的特性，在大多数被子植物中，cpDNA 为单亲母系遗传，有自己独立未被干扰的进化历史，可用于追溯植物起源和迁移历史；且 cpDNA 为单拷贝基因，后期 PCR 扩增、测序和序列分析的可行度较高（Badenes & Parfitt，1995；Petit et al.，2005）。探索植物 cpDNA 序列变化获得物种演化信息，可搭建联系居群水平的分化过程与宏观进化的系统地理学关系之间的桥梁。因此，我们利用草果、拟草果 cpDNA 的序列变化，试图探寻草果的栽培地理起源，以期为草果种质资源的保护、利用奠定基础。

1. 材料与方法

1.1 材料

样品采自中国云南和广西、越南河江（表 1、图 1），凭证标本存于云南中医药大学。8 个草果居群无拟草果伴生，TBG 种源自越南经缅甸而来，其余 7 个由当地供销社上世纪从云南文山州、红河州引种栽培。每个草果居群随机选取 7～26 个植株，植株之间相距≥5 m；生长在草果居群周边（直线距离≤200 m）的全部拟草果植株作一个居群，悉数采样。每一植株选取健康叶片，置于含硅胶的密封袋中干燥，并于−20 ℃冰箱中保存。

表 1 实验材料的采集信息

Table 1 Information of experimental materials

序号 Code	居群 Population	采集地 Location	经度 Longtitude	纬度 Latitude	海拔(米) Altitude(m)	样本量 Individual
1	GLJ	中国云南马关县古林菁乡 Gulinjing, Maguan county, Yunnan, China	E103°59′15.72″	N22°51′57.54″	1540	26
2	MB	中国云南马关县马白镇 Mabai, Maguan county, Yunnan, China	E104°26′03.69″	N23°05′04.74″	1368	10
3	RH	中国云南马关县仁和镇 Renhe, Maguan county, Yunnan, China	E104°18′16.11″	N22°55′10.88″	1473	10
4	FD1	中国云南西畴县法斗乡 Fadou, Xichou county, Yunnan, China	E104°49′19.98″	N23°22′19.56″	1670	10
5	FD2	中国云南西畴县法斗乡 Fadou, Xichou county, Yunnan, China	E104°49′39.84″	N24°22′22.26″	1540	15
6	ML	中国云南麻栗坡县麻栗镇 Malipo, Malipo county, Yunnan, China	E104°43′06.92″	N23°03′33.12″	1245	10
7	TC	中国云南麻栗坡县铁厂乡 Tiechang, Malipo county, Yunnan, China	E105°04′09.03″	N23°18′53.88″	1620	16
8	YP	中国云南屏边县玉屏镇 Yuping, Pingbian county, Yunnan, China	E103°41′52.98″	N22°54′55.98″	2046	15
9	ADB1	中国云南金平县阿得博乡 Adebo, Jinping county, Yunnan, China	E103°13′08.86″	N22°54′13.01″	1477	16
10	ADB2	中国云南金平县阿得博乡 Adebo, Jinping county, Yunnan, China	E103°13′52.89″	N22°54′04.90″	1582	15
11	LC	中国云南绿春县大兴镇 Daxing, Lvchun county, Yunnan, China	E102°27′03.23″	N22°59′20.39″	1989	20
12	HS	中国云南陇川县户撒乡 Husa, Longchuan county, Yunnan, China	E97°43′05.35″	N24°22′32.29″	1775	10
13	SD	中国云南盈江县苏典乡 Sudian, Yingjiang county, Yunnan, China	E97°59′13.05″	N25°10′24.48″	1862	14
14	TBG	中国云南盈江县铜壁关乡 Tongbiguan, Yingjiang county, Yunnan, China	E97°41′16.32″	N24°40′53.43″	1670	14
15	LJ	中国云南隆阳区潞江镇 Lujiang, Longyang district, Yunnan, China	E98°46′30.06″	N24°50′17.34″	2070	7
16	TY	中国云南腾冲县腾越镇 Tengyue, Tengchong county, Yunnan, China	E98°30′07.74″	N25°03′42.12″	2219	15
17	ZH	中国云南腾冲县中和镇 Zhonghe, Tengchong	E98°20′56.38″	N25°07′26.32″	1607	10

		county, Yunnan, China				
18	JX	中国广西金秀县金秀镇 Jinxiu, Jinxiu county, Guangxi, China	E110°12′13.68″	N24°05′58.92″	1065	14
19	XH	中国广西那坡县百省乡 Baishen, Napo county, Guangxi, China	E105°45′05.94″	N23°10′46.20″	880	15
20	GB	越南河江省管箔县 Guangbo county, Hejiang, Vietnan	E104°57′05.21″	N23°09′05.92″	1281	10
21	FDy	中国云南西畴县法斗乡 Fadou, Xichou county, Yunnan, China	E104°46′16.68″	N23°22′26.78″	1478	13
22	RHy	中国云南马关县仁和镇 Renhe, Maguan county, Yunnan, China	E104°18′13.89″	N22°55′04.51″	1473	7
23	TCy	中国云南麻栗坡县铁厂乡 Tiechang, Malipo county, Yunnan, China	E105°04′13.45″	N23°18′54.03″	1700	15
24	YPy	中国云南屏边县玉屏镇 Yuping, Pingbian county, Yunnan, China	E103°41′53.62″	N22°55′43.21″	1887	12
25	BSy	中国广西那坡县百省乡 Baishen, Napo county, Guangxi, China	E105°45′05.94″	N23°10′46.20″	880	15
合计 Total						272+62

注：1-20 为草果居群，21-25 为拟草果居群。草果的 ADB2、XH 和 GB 居群与拟草果同域生长。

Note: 1-20 represents populations of *A. tsao-ko*, and 21-25 as populations of *A. paratsao-ko*. ADB2, XH and GB populations of *A. tsao-ko* were cultivated throughout the range of *A. paratsao-ko*.

1.2 仪器与试剂

PCR 扩增仪（BIO-RAD C1000）、常温离心机（Eppendorf，Centrifuge 5415D）、凝胶电泳仪（BIO-RAD，Power Pac Basic）、凝胶成像系统（BIO-RAD，Universal HoodII）。植物基因组 DNA 提取试剂盒（北京百泰克，DP3112）、PVP-40、EDTA、Tris、Taq PCR 等。

1.3 总 DNA 的提取

采用改良植物基因组 DNA 快速提取试剂盒提取总 DNA。对试剂盒说明书操作步骤稍作改动，加入 Buffer P1 和 RNase 后水浴 30 min。DNA 洗脱时分 2 次加入 EB 洗脱液，依次为 30 μL、20 μL。1%琼脂糖凝胶电泳检测后，将提出的 DNA 存于−20 ℃冰箱，备用。

1.4 引物的筛选

依据文献初步筛选出 5 对 cpDNA 序列（表 2）。其中，*trn*H^{GUG}-*psb*A、*rps*16F-*rps*R 与 *trn*L-*trn*F 序列能更好地扩增材料总基因组 DNA，且 PCR 产物双向测序结果较好。

表 2 预实验中所有 5 对 cpDNA 序列引物信息、引物来源

Table 2　Primer sequences and sources of five pairs of cpDNA in the pre-experiment

编号 Codes	引物名称 Primer name	序列 5′-3′ Sequence 5′-3′	参考文献 References
1	*trn*H^GUG	CGCGCATGGTGGATTCACAATCC	Tata & Simpson, 2003
	*psb*A	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	Sang & Stuessy, 1997
2	*rps*16F	AAACGATGTGGTARAAAGCAAC	Tata & Simpson, 2003
	*rps*16R	AACATCWATTGCAASGATTCGATA	
3	*trn*D	ACCAATTGAACTACAATCCC	Demesure, 1995
	*trn*T	CTACCACTGAGTTAAAAGGG	
4	*trn*G	GAACGAATCACACTTTTACCAC	Hamilton, 1999
	*trn*S	GCCGCTTTAGTCCACTCAGC	
5	*trn*L	CGAAATCGGTAGACGCTACG	Taberlet et al., 1991
	*trn*F	ATTTGAACTGGTGACACGAG	

1.5 PCR 扩增

扩增体系：总体积为 25 μL，其中，Taq DNA 聚合酶（1.0 U/μL）12.5μL，正反向引物（10 μM）各 1.5 μL，DNA 模板（30 ng/μL）1 μL，ddH$_2$O 加至 25 μL。扩增程序为 94 ℃预变性 4 min，94 ℃变性 40 s；开始循环，64 ℃退火 30∽40 s，72 ℃延伸 40 s，循环 33 次；72 ℃延伸 6 min。产物存-4 ℃冰箱，送上海生工（Sangon Biotech）双向测序。

1.6 数据分析

GenesCode Sequencher 5.4.5 软件拼接测序所得的双向序列，ClustalX 2.0.10（Larkin et al.，2007）自动排列比对，结果导入 Bioedit7.05 软件（Hall，1999）手工校对调整，矩阵中有系统发育信息的空位（Gap）按照插入缺失简单编码方法编码（刘杰，2011）。

1.6.1 序列变异与单倍型分布

利用 Bioedit7.05 软件分别将比对完成的 3 个序列的两端切平，统计每一序列长度。MEGA 7.0.14 软件确定 3 个序列中碱基 G+C 含量、特异变异位点、矩阵中包含的碱基插入/缺失情况。DnaSP 6.10.01 分别计算 3 个序列核苷酸多态性（Nucleotide diversity, π）、单倍型多样性（Haplotype diversity，H_d）（Nei，1981；Borowsky，2001），以及单倍型在居群中的分布。

常用参数 π 和 θ 衡量核苷酸多态性(Nei，1979；刘杰，2011)。基于软件 Network 5.0.1.0

中值连接法（Median-joining network），利用最大简约标准对所有单倍型序列进行种内谱系的单倍型网络分析，最后结合采样点经纬度信息将居群单倍型分布以及共享情况利用 Adobe Illustrator CC 2019 绘制成单倍型地理分布图。

1.6.2 居群遗传多样性与遗传结构分析

利用 PermutcpSSR 1.2.1 计算物种总的遗传多样性（H_T）、平均遗传多样性（H_S）。联合每一个体的 3 个序列拼接结果，利用 Arlequin version 3.5.1.2 检测居群遗传结构。

1.6.3 邻接系统进化树构建

利用 MEGA 7.0.14 软件的系统发育模块（Phylogeny）构建 NJ 邻接树（Neighbor-joining tree）。基于 Kimura 2 - parameter（K-2P）模型和自举法（Bootstrap method）计算居群对之间的平均遗传距离（Compute between group mean distance）；自举法重复次数（Replications）设置为 1000；替换包括（Substitutions to include）设置为“d：过渡+横向（d：Transitions+Transversions）”；位点之间的速率（Rates among sites）设置为统一速率（Uniform rates）；差距/缺失数据处理（Gaps/Missing data treatment）设置为完全删除（Complete deletion）。

2. 结果与分析

2.1 序列特征和单倍型检测

3 个序列 G+C 含量在 29.6%～32.7%之间，符合叶绿体 GC 含量低的特点（孙果丽，2015）。3 个序列均有碱基插入/缺失，π 与 θ 的值均小于 0.01。联合序列对齐后的长度为 2 258 bp，多态性信息位点为 66 个，共有 18 个碱基的插入/缺失（表 3）。将联合片段应用于单倍型检测，依据碱基的插入缺失、替换得到 7 种单倍型（表 4）。

表 3　三个 cpDNA 序列和联合序列的序列特征

Table 3　Characteristics of each cpDNA sequence and the combination of three sequences

cpDNA 片段 cpDNA sequences	长度 Size(bp)	GC 含量 G+C(%)	位点 Sites	核苷酸多态性 Nucleotide diversity		碱基插入缺失 Bases	
				π	θ	event	Site
*trn*H^{GUG}-*psb*A	702	29.6	18	0.00381	0.00421	7	37
*rps*16F-R	672	32.2	21	0.00277	0.00452	6	44
*trn*L-F	884	32.7	29	0.00535	0.00538	5	31
Comb-Fr*	2258	33.0	66	0.00423	0.00487	18	112

* Comb-Fr：Combined Fragments，为联合片段。

表 4　联合片段所检测到的 7 种单倍型的序列多态性

Table 4　Polymorphism of 7 haplotypes detected in the combined fragment

单倍型 Haplotype	样本量 Individual	片段位置 Fragment location																								
		152	157	496	603	925	926	927	928	929	930	1383	1479	1585	1829	1890	1891	1892	1893	1894	1941	1942	2075	2175	2178	2189
H1	187	T	G	C	T	-	-	-	-	-	-	A	·	G	T	T	G	A	A	T	G	·	G	A	G	·

H2	15	-	-	-	G	C	A	A	T	A	T	G	T	T	C	-	-	-	-	-	T	A	A	T	T	C
H3	13	-	-	-	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	-	-	-	-	-	·	·	·	·	·	·
H4	7	-	-	-	T	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	-	-	-	-	-	·	·	·	·	·	·
H5	10	-	-	-	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	-	-	-	-	-	·	C	·	·	·	·
H6	13	-	-	-	·	·	·	·	·	·	·	·	A	·	·	-	-	-	-	-	·	·	·	·	·	·
H7	12	-	-	-	·	·	·	·	·	·	·	·	A	·	·	-	-	-	-	-	·	·	·	·	·	T

附注："-"表示单核苷酸的缺失，"·"表示碱基类型与 H2 保持一致。

Note: "-" indicates missing of single nucleotide, "·" indicates the basetypes were same as H2.

2.2 单倍型在草果和拟草果中的分布及其关系

H1 分布最广，为普通单倍型；H2 和 H4 的个体数极少，为稀有单倍型；H6 仅分布于 XH 居群，H4、H5、H7 分别分布于 RHy、TCy、YPy 居群（表 5）。TC、YP 居群各有 2 个单倍型；综合观察，云南麻栗坡（TC、ML、TCy）检测到 4 种单倍型，为单倍型类型最丰富的地区，其次是西畴（FD1、FD2、FDy）、屏边（YP、YPy）、那坡（XH、BSy），均有 3 种单倍型（表 1，表 5，图 1）。云南麻栗坡、西畴、屏边属于滇东南小区，为红河和哀牢山以东的云南南缘地带（吴征镒和朱彦，1987），邻接广西那坡。

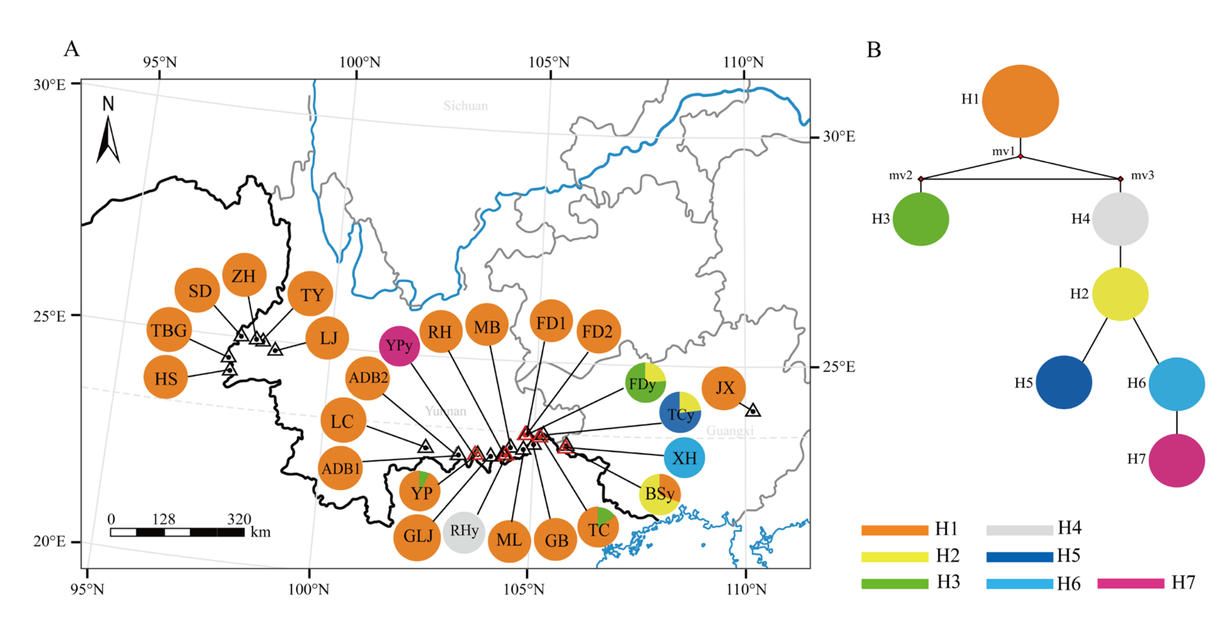


图 1　草果、拟草果基于 cpDNA 的单倍型网络图。

Fig1　Haplotype network of *A. tsao-ko* and *A. paratsao-ko* based on cpDNA.

图注：(A)单倍型地理分布图，圆大小代表居群个体数多少，饼状图为各单倍型占比；(B)中央网络连接图。图中应用到中国地图来源于中华人民共和国自然资源部提供的标准地图，审图号为 GS(2016)1582 号。

Note: (A) Haplotype geographical distribution map. The circle size represents the number of individuals in the population. Size of pie charts is proportional to the numbers of individuals

sequenced in each population. (B) Median-joining network. one standard map of China was used to draw Fig1, which was provided by the Ministry of Natural Resources of the People's Republic of China, and review numbers was GS (2016) 1582.

H2 位于网络图的中央位置，可能表明其为祖先单倍型；H2 与 H3、H4 之间亲缘关系较远，H3 和 H4 需要经过三次突变才能得到 H1；H4、H5、H6 均由 H2 分别经过一步突变而来，它们与 H2 的亲缘关系较近，又和 H7 共同聚为一支（图 1）。可能表明 H2、H4、H5、H6、H7 是较原始的单倍型，而与它们关系较远的 H1、H3 是衍生的单倍型。因此，TCy、FDy 可能是在本研究系统中最原始的居群，它们都具有祖先单倍型 H2。比较 H5、H3 与 H2 亲缘关系的远近，TCy 可能比 FDy 更为原始，更接近祖先居群。RHy、BSy、XH 可能也是比较原始的居群，它们分别具有与祖先单倍型亲缘关系较近的单倍型 H4、H5 和 H6。因此，云南麻栗坡、西畴、马关、广西那坡可能是草果的栽培起源中心，而麻栗坡（铁厂）可能是这一中心的核心区域，向周边的西畴、马关、屏边、那坡扩张。

H1、H3 在拟草果和草果中共享，H1 主要发生在草果居群，19 个草果居群均有 H1，拟草果仅 BSy 的 4 个植株有；H3 主要集中在 FDy，草果仅 YP 的 2 个植株、TC 的 4 个植株有。可能反映 H1 和 H3 的发生在草果栽培驯化之前，栽培驯化后祖先遗传多态性在两个世系（谱系）中的分选和保持。H6 经由 H2 一步突变而来，可能是一个古老单倍型，发生在栽培驯化之前。H6 经一步突变后得到 H7，H7 仅存于 YPy（图 1），且频率不高（4.67%），与 H6 的频率（5.06%）接近（表 5）。因此，H6 可能在拟草果中绝迹了，或是在样品采集中遗漏了。此外，草果的 3 个单倍型（H1、H3、H6）源于拟草果的单倍型 H2、H4。

表 5　cpDNA 单倍型在 25 个居群中的分布情况

Table 5　Distribution of cpDNA haplotypes among 25 populations

居群 Population	单倍型多样性指数 Haplotype diversity (*Hd*)	核苷酸多样性指数 Nucleotide diversity (*π*)	单倍型频率 Haplotype frenquency （%）						
			H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7
ADB1	0.00000	0.00000	6.22						
ADB2	0.00000	0.00000	5.06						
FD1	0.00000	0.00000	2.33						
FD2	0.00000	0.00000	5.45						
GLJ	0.00000	0.00000	7.39						
HS	0.00000	0.00000	1.17						
LC	0.00000	0.00000	5.84						
LJ	0.00000	0.00000	2.72						
MB	0.00000	0.00000	1.94						
ML	0.00000	0.00000	2.33						
RH	0.00000	0.00000	0.78						
SD	0.00000	0.00000	3.89						
TBG	0.00000	0.00000	3.50						
TC	0.28205	0.00739	4.28		0.78				

TY	0.00000	0.00000	5.06						
YP	0.15385	0.00403	4.67		0.39				
JX	0.00000	0.00000	5.45						
ZH	0.000000	0.000000	1.17						
GB	0.00000	0.00000	1.95						
XH	0.00000	0.00000						5.06	
频率 Frequency			90.45		2.01			6.53	
FDy	0.38462	0.01008		1.17	3.89				
YPy	0.000000	0.000000							4.67
RHy	0.00000	0.00000				2.72			
TCy	0.38462	0.00017		1.17			3.89		
BSy	0.46154	0.00230	1.56	3.50					
频率 Frequency			6.90	25.86	17.24	12.07	17.24		20.69
总频率 Total Frequency			72.76	5.84	5.06	2.72	3.89	5.06	4.67

2.3 遗传多样性和遗传结构

草果 20 个居群 259 个植株共检测到 3 种单倍型，占单倍型种类的 42.86%，占植株数量的 1.10%。拟草果 5 个居群 58 个植株共检测到 6 种单倍型，相应数值为 85.71%和 9.68%。2 个共享单倍型占草果单倍型频率的 92.46%，相应地仅占拟草果的 24.14%（表 5）。说明拟草果遗传多样性高于草果。

草果居群的单倍型多样性（*Hd*）和核苷酸多样性指数（π），18 个居群均为 0，TC 最高，其次是 YP，说明这 2 个居群遗传多样性高于其他 18 个居群。FDy 有两种单倍型，*Hd*、π 值最高，遗传多样性最高；遗传多样性较高的还有 BSy 和 TCy。大多数草果居群遗传多样性都比较低，拟草果居群遗传多样性较高（表 5）。因此，云南麻栗坡、西畴、屏边、马关，广西那坡可能是草果、拟草果遗传多样性中心，也可能是草果栽培起源中心。TC、YP 的遗传多样性高于其他 18 个草果居群，可能说明它们经历的人工选择较小，从而保留了较多的遗传多样性，更接近祖先居群。所以，云南麻栗坡、屏边很可能是草果的栽培起源中心。

草果、拟草果居群遗传多样性检测表明，草果居群总的遗传多样性 H_T=0.121，居群内平均遗传多样性 H_S=0.022，核苷酸多态性 π =0.00152；而拟草果居群分别为 H_T=0.963、H_S=0.246、π =0.00852；草果居群的遗传多样性远小于拟草果居群。AMOVA 分析，草果居群的遗传变异主要来源于居群内（58.08%），拟草果居群主要来源于居群间（71.52%）；居群间的遗传分化程度，草果（F_{ST}=0.41915，P<0.01）远小于拟草果（F_{ST}=0.71521，P<0.01）（表 6）。

表 6　草果居群与拟草果居群的分子方差分析

Table 6　AMOVA analysis of *A. tsao-ko* populations and *A. paratsao-ko* populations

物种 Species	变异来源 Source of variation	自由度 d.f.	总方差 Sum of squares	方差分量 Variance components	变异百分数 Percentage variation	显著性检验 *P*-value
草果	居群间 Among populations	19	354.845	1.66592	41.92%	P<0.01

A. tsao-ko	居群内 Within populations	252	413.231	2.30855	58.08%	*P*<0.01
	总体 Total	271	768.075	3.97447		
	居群间遗传分化系数 F_{ST} among populations			0.41915		
拟草果 *A. paratsao-ko*	居群间 Among populations	4	1033.110	21.73881	71.52%	*P*<0.01
	居群内 Within populations	57	458.769	8.65602	28.48%	*P*<0.01
	总体 Total	61	1491.879	30.39483		
	居群间遗传分化系数 F_{ST} among populations			0.71521		

2.4 居群系统发育关系和草果栽培起源分析

3 个 cpDNA 序列联合后，构建了 20 个草果居群与 5 个拟草果居群间的系统发育关系，所有分支支持率均大于 50%。FDy 单独聚为一支，与其他 24 个居群的亲缘关系较远。种间水平上草果与拟草果各自分支；除 XH，草果 19 个居群聚为一支，且没有进一步的分支。4 个拟草果居群，YPy、TCy、BSy 聚为一支，RHy 单独聚为一支（图 2）。与草果相比，拟草果则有明确的拓扑结构，并且有较高的支持率。一方面再次佐证草果种质来源较为均一，另一方面也提示基于单亲遗传的 *trn*H^{GUG}-*psb*A、*rps*16F-*rps*16R 与 *trn*L-*trn*F 序列联合片段的变异多态性分析结果未能有效揭示草果居群遗传结构、栽培驯化过程中的动态变化情况。

XH 与拟草果聚为一支，并与 YPy 聚为一小支，提示 XH 与 YPy 的亲缘关系最近，其次是与 TCy、BSy 亲缘关系较近。H6 只在 XH 中发现，H6 与 H2 亲缘关系较近。可能提示 XH 是与拟草果亲缘关系最近的草果居群，也是一个较原始的、遗传结构较接近祖先居群的草果居群，这与依据单倍型网络关系图推导的结论一致。因此，那坡可能是草果的一个栽培起源中心。基于拟草果和草果的系统关系（Xia，2004），以及 YPy、TCy、BSy 与草果居群的亲缘关系较近，屏边玉屏、麻栗坡铁厂、那坡百省可能也是草果的栽培驯化中心。

RHy 单独聚为一小支，提示该居群可能比 YPy、TCy、BSy 拥有更早的进化关系；该居群独有 H4，H4 分别经过 3 次突变可得到 H1、H3；而且 H4 是连接祖先单倍型 H2 和草果普通单倍型 H1 的桥梁。因此，马关可能也是草果栽培起源中心。FDy 单独聚为一支，它是唯一既有祖先单倍型 H2，又有衍生单倍型 H3 的拟草果居群，这可能是与其他 24 个居群亲缘关系较远的原因；H3 又为共享单倍型。因此，西畴法斗可能是草果栽培地理起源中心。

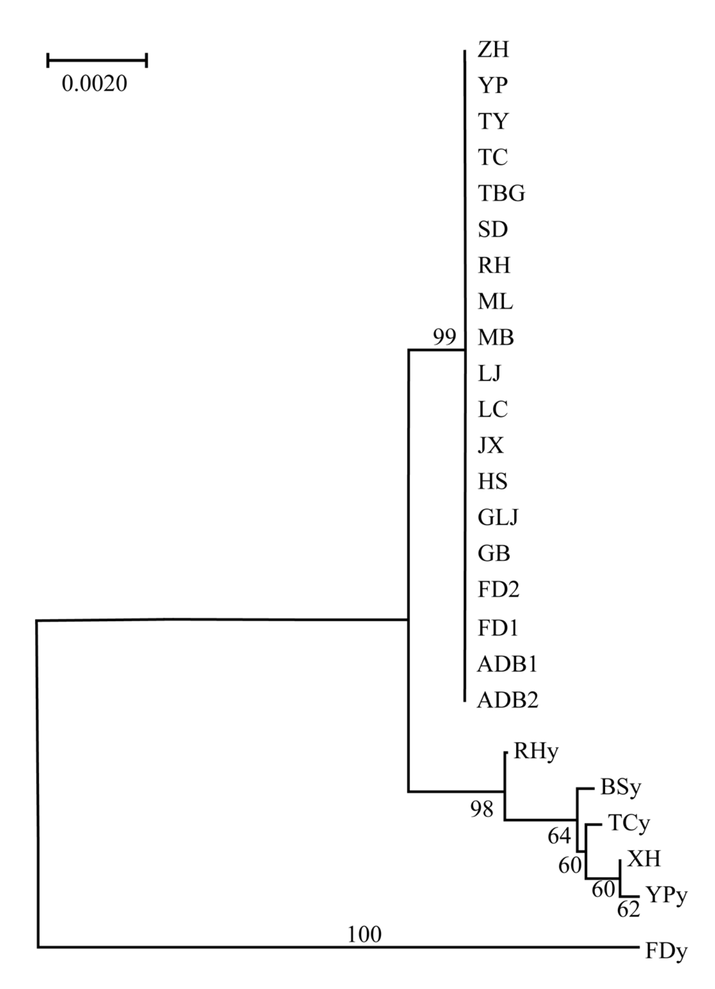


图 2　基于 cpDNA 非编码区联合序列构建的草果、拟草果居群邻接（NJ）树

Fig 2　Neighbor-joining distance tree based on cpDNA non-coding region combined fragment of *A. tsao-ko* and *A. paratsao-ko* populations

3. 讨论与结论

单倍型网络关系图提示草果的 3 种单倍型没有完全集成一个单系，H1 和 H3 分布于网络图的一端，私有单倍型 H6 混在拟草果单倍型之中。因此，7 个单倍型的谱系关系和物种没有明显联系，可能是祖先遗传多态性在两个世系（谱系）中分选、保留的结果，也可能存在基因流。草果、野草果（*A. koenigii*）间人工杂交已有成功报道（崔晓龙等，1995a），草果和拟草果间未见报道。种间基因渗入只发生在同域物种之间（Kenneth & Barbara，1999）。YP 和 YPy 有植株混杂，并无共享单倍型；XH 和邻近的 BSy 无共享单倍型；FDy 与 FD1、FD2 相邻也无共享单倍型。可能说明自然状态下草果与拟草果之间没有基因渗入；也可能是样本少的缘故（草果：40 株，拟草果：25 株）。

人类农业起源没有超过 1 万年（Kenneth & Barbara，1999），因此，草果栽培起源是一个距今时间较短的事件。H1、H3 在拟草果和草果中共享，推测它们可能发生在草果栽培驯化之前，而栽培驯化后祖先的遗传多态性则在两个世系中进行分选和保持。目前认为豆蔻属起源于喜马拉雅，通过南亚向澳大利亚北部扩散，一直延伸到太平洋中部（Kiew，1982；

Smith，1985）。而豆蔻属是起源、分化历史不久远的类群，也支持了拟草果和草果是新近分化的物种。拟草果是草果亲缘关系最近的同属野生植物，系统发育分析中又共同构成单系（Xia，2004），它们可能有新近的共同祖先。有新近共同祖先的物种间发生谱系分选的可能性很大（Nevo & Karlin，1986；Wu，1991）。因此，基于单亲遗传的 *trn*H^{GUG}-*psb*A、*rps*16F-*rps*16R 与 *trn*L-*trn*F 序列联合片段的变异多态性分析结果，除了单倍型 H6，草果单倍型是拟草果单倍型的子集。草果栽培驯化过程反映了祖先遗传多态性在世系间的分选、保留。19 个草果居群都有 H1，有 H1 的草果植株可能在早期栽培中农艺性状表现较好，例如，成活率较高、繁殖力较强、果实产量较高等优势而容易被选择保留。和其他栽培植物一样，在长期栽培驯化过程中，这样的人工选择会导致遗传多样性的大量丢失。

草果各地之间相互引种栽培，又存在以老株分化替代、发展新株的繁殖方式（崔晓龙等，1995b），导致个体遗传背景、居群种质趋于均一化。草果在长期的栽培驯化中可能经历了较强的人工选择压力，导致高频率等位基因有效固定，而低频率等位基因则严重丢失，最终，遗传多样性严重丢失，遗传背景愈加狭窄化。与拟草果居群相比，也可说明草果栽培驯化过程中遗传多样性大量丢失的事实。栽培植物遗传多样性的减少似乎是栽培植物和野生近缘植物系统（crop-relative systems）中的一个规律（Doebley，1989；Soltis et al.，1992；Hecht，1993；Tanksley & McCouch，1997），可能反映了在栽培驯化过程中人工选择、建立事件（founder event）导致的遗传漂变致使栽培植物遗传多样性减少（Ladizinsky，1985；Doebley，1989；Eyre-Walker，1998）。这种模式也可能提示拟草果和草果之间是祖先-衍生者关系（progenitor-derivative relationship）。当然，栽培植物与其近缘植物之间的遗传多样性变化反映了许多互相作用的进化因素而难以简单评价（Doebley，1989）。

基于草果、拟草果的系统关系，2 个共享单倍型发生在 FDy 和 BSy，提示西畴法斗、那坡百省可能是草果栽培地理起源中心。从草果单倍型多样性、居群遗传多样性的角度，可考虑加入屏边玉屏和麻栗坡铁厂；从拟草果单倍型多样性的角度，可考虑加入马关仁和；最后结合居群系统发育关系分析，由屏边（玉屏，大围山范围内）、马关（大围山范围内）、西畴（法斗）、麻栗坡（铁厂）组成的这个云南东南部的前端地域，和邻接的广西那坡（下华，属百省乡）共同构成的这一区域可能是草果栽培驯化的地理起源中心。这一结论与毛品、冯国楣先生早期的草果采集记录吻合，他们分别采集于屏边、西畴，童绍全采集于马关、麻栗坡（童绍全，1998）。草果大量引种发生在上世纪 70 年代末至 80 年代，由各地供销社组织。麻栗坡（铁厂）可能是这一中心的核心区域，以麻栗坡为核心区域，向周边的西畴、马关、屏边、那坡扩张。这一结论可为草果核心种质构建、种质资源收集和保护，以及种植模式和栽培管理的研究提供一定的遗传学依据。

在长期栽培驯化过程中，草果遗传多样性大量丢失，造成现有遗传资源单一化，表现为草果居群遗传多样性远小于拟草果居群，草果居群遗传变异主要来源于居群内，而拟草果居群主要来源于居群间。TC、YP 这 2 个草果居群的遗传多样性、单倍型多样性高于其他 18

个草果居群；而 XH 具有草果私有单倍型，建议对它们加以保护和利用。FDy 是研究系统中遗传多样性最高的居群，为促进草果质量和产量的提高而储备野生种质资源，对 FDy 深入研究、保护、利用可能对草果产业的发展有重要的意义。

参考文献

BADENES M L, PARFITT D E, 1995. Phylogenetic relationships of cultivated *Prunus* species from an analysis of chloroplast DNA variation [J]. Theor Appl Genet, 90(7-8): 1035-1041.

BOROWSKY RL, 2001. Estimating nucleotide diversity from random amplified polymorphic DNA and amplified fragment length polymorphism data [J]. Mol Phylogenet Evol, 18(1): 143-148.

CHINESE PHARMACOPOEIA COMMISSION, 2020. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (2020), vol. 1［M］. Beijing: Chinese Medical Science and Technology Press: 249-250. ［中国药典委员会, 2020. 中华人民共和国药典 (2020)，一部［M］. 北京：中国医药科学和技术出版社：249-250.］

CUI XL, WEI RC, HUANG RF, 1995a. A preliminary study on the genetic system of *Amomum tsaoko*［J］. J Yunnan Uni nat sci ed, 17(3) : 290-297. ［崔晓龙，魏蓉城，黄瑞复, 1995. 草果遗传体系的初步研究. 云南大学学报（自然科学版）, 17（3）：290-297.］

CUI XL, WEI RC, HUANG RF, 1995b. Study on the artificial population structure of *Amomum tsaoko*［J］. S Ch J Agric Sci, 8(4): 114-118.［崔晓龙, 魏蓉城，黄瑞复，1995b. 草果人工种群结构研究 [J]. 西南农业学报，8(4): 114-118.］

DEMESURE B, SODZI N, PETIT RJ, 1995. A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants [J]. Mol Ecol, 4(1): 129-134.

DOEBLEY J, 1989. Isozymes [M]// SOLTIS DE & SOLTIS PS. Plant Biology. Portland: Dioscorides OR: 165–191.

SOLTIS PS, SOLTIS DE, DOYLE JJ, 1992. Molecular systematics of plants [M]. New York: Chapman & Hall: 202–222.

EYRE-WALKER A, GAUT RL, HILTON H, et al., 1998. Investigation of the bottleneck leading to the domestication of maizeProc [J]. P Natl Acad Sci USA, 95: 4441-4446.

HECHT MK, 1993. Evolutionary biology [M]. New York: Plenum: 51-94.

HALL TA, 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [J]. Nucl Acids Symp, 41(41):95-98.

HAMILTON MB, 1999. Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation [J]. Mol Ecol, 8(3): 521-523.

KENNETH MO, BARBARA AS, 1999. Evidence on the origin of cassava: Phylogeography of *Manihot esculenta* [J]. P Natl Acad Sci USA. 96(10): 5586-5591.

KIEW KY, 1982. The genus Elettariopsis (Zingiberaceae) in Malaya [J]. Not RBG Edinb, 40(1): 139-152.

LADIZINSKY G, 1985. Founder effect in crop-plant evolution [J]. Econ Bot, 39(2): 191-198.

LARKIN, BLACKSHIELD SG, BROWN NP, et al., 2007. Clustal W and clustal X version 2.0 [J]. Bioinformatics, 23(21): 2947-2948.

LIU J, 2011. Phylogeography of Taxus wallichiana Zucc [D]. Kunming: Kunming Institute of Botany Chinese Academy of Sciences：37-60, 111-113.［刘杰，2011. 喜玛拉雅红豆杉的谱系地理学研究 [D]. 昆明：中国科学院昆明植物研究所：37-60，111-113.］

MING JH, HU YH. 2004. Dynamic analysis on production and market of *Amomum tsaoko*[J]. J Chin Med Mat, 27(6): 449-451.［明建鸿, 胡耀华，2004. 草果的产销动态分析 [J]. 中药材，27（6）：449-451.］

NEI M, LI WH, 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. P Natl Acad Sci USA, 76(10): 5269-5273.

NEI M, TAJIMA F, 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases [J]. Genetics, 97(1): 145-163.

NEVO E, KARLIN S, 1986. Evolutionary processes and theory [M]. New York: Academic: 515–534.

PETIT R J, DUMINIL J, FINESCHI S, et al., 2005. Invited review: comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations [J]. Mol Ecol, 14(3): 689-701.

SANG T, STUESSY CTF, 1997. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae) [J]. Am J Bot, 84(8): 1120-1136.

Smith RM, 1985. A review of Bornean Zingiberraceae I. (Alpineae p.p.) [J]. Not RBG Edinb, 42(2): 261-314.

SUN GUO-LI, 2015. Molecular phylogeography of *Caragana microphylla* Lam. inferred from chloroplast DNA sequences variation [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences:12-20. ［孙果丽，2015. 基于 cpDNA 序列的小叶锦鸡儿分子谱系地理学研究 [D]. 北京：中国农业科学院：12-20.］

TABERLET P, GIELLY L, PAUTOU G, et al., 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA [J]. Plant Mol Biol, 17(5):1105-1109.

TANKSLEY SD, MCCOUCH SR, 1997. Seed banks and molecular maps: Unlocking genetic potential from the wild [J]. Science, 277(5329):1063–1066.

TATE JA, SIMPSON BB, 2003. Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid Species [J]. Syst Bot, 28(4): 723-737.

TONG SHAO-QUAN, 1998. Revision and additional notes of Zingiberaceae of Yunnan, China [J]. Bull Bot Res, 18(2): 137-143.［童绍全，1998. 云南姜科植物的增补与修[J]. 植物研究，18（2）：137-143.］

TONG SHAO-QUAN, et al., 1997. Flora of Yunnan (vol. 8) [M]. Beijing: Science Press: 618-642. ［童绍全，等，1997. 云南植物志（8卷）[M]. 北京：科学出版社：618-642.］

WU CI, 1991. Inferences of species phylogeny in relation to segregation of ancient polymorphisms [J]. Genetics, 127(2): 429-435.

WU ZY, RAVEN PH, 2000. Flora of China Vol. 24 (Zingiberaceae) [M]. Beijing: Science Press, and St. Louis: Missouri Botanical Garden Press.

WU ZY, ZHU YC, 1987. Yunnan vegetation [M]. Beijing: Science Press: 31-32.［吴征镒，朱彦丞，1987. 云南植被 [M]. 北京：科学出版社：31-32.］

XIA YONG-MEI, W JOHN KRESS, LINDA M PRINCE, 2004. Phylogenetic analyses of *Amomum* (Alpinioideae: Zingiberaceae) using ITS and *mat*K DNA sequence data [J]. Syst Bot, 29(2): 334-344.

XU GUO-JUN, 1997. Collation and research on the varieties of common materia medica (vol.3)

[M]. Fuzhou: Fujian Science and Technology Press: 39-46.［徐国钧，1997．常用中药材品种整理和研究（第三册）[M]．福州：福建科学技术出版社：39-46.］